

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45057> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Yang, S.

Title: Toll-like receptor signaling in the innate immune system of zebrafish larvae

Issue Date: 2016-12-20

Nederlandstalige samenvatting

In dit proefschrift beschrijf ik mijn studies naar de zebrafish orthologen van de menselijke TLR5- en TLR2-receptorgenen. Dit zijn genen van het aangeboren immuunsysteem die verantwoordelijk zijn voor, respectievelijk, de herkenning van bacterieel flagelline en een breed spectrum aan bacteriële celwandcomponenten. Een belangrijk aandachtspunt van dit proefschrift is het verschil in het netwerk van genen dat door TLR5- en TLR2-siginaaltransductie op transcriptieel niveau wordt aangestuurd. Bovendien heb ik onderzoek gedaan naar andere genen die een centrale rol spelen in de TLR-siginaaltransductie, waaronder TRAF6 en IKK2. Om de biologische functies van deze immuungenen te bestuderen heb ik onderzocht hoe zebrafishlarven reageren op infectie met de vispathogeen *Mycobacterium marinum*, een naaste verwant van *Mycobacterium tuberculosis*, de bacterie die bij de mens tuberculose veroorzaakt. Om inzicht te verkrijgen in de systeembioologie van genregulatie door TLR-receptoren heb ik gebruik gemaakt van nieuwe mogelijkheden voor genomische analyse van genexpressie, genaamd transcriptoomanalyse, waarbij alle geproduceerde RNA-moleculen worden gekwantificeerd met behulp van sequentiebepaling. Ook heb ik verschillende genetische methoden gebruikt om de activiteiten van genen te verminderen (knockdown) of uit te schakelen (mutatie) om daarmee de functies van genen in de TLR-siginaaltransductie verder te onderzoeken.

In **hoofdstuk 2**, wordt aangetoond dat siginaaltransductie door Tlr2 in zebrafishlarven op dezelfde manier functioneert als in zoogdiercellen. Dit is getest door analyse van de regulatie van genexpressie van bekende immuungenen na stimulatie van zebrafishembryo's met lipopeptiden. Voor deze studie hebben we gebruik gemaakt van een stof genaamd Pam₃CSK₄. Dit is een synthetisch lipopeptide dat het geacyleerde aminozuuruiteinde van bacteriële lipoproteïnen nabootst en dat in experimenten met zoogdiercellen vaak gebruikt wordt om TLR2 te activeren. De transcriptoomprofielen die het gevolg zijn van de siginaaltransductie door TLR2 en TLR5 na stimulatie door Pam₃CSK₄ en flagelline zijn bepaald met behulp van diepgaande sequentieanalyse van RNA-moleculen. De resultaten laten zien dat er een relatief kleine overlap is tussen de reacties op transcriptieel niveau na stimulatie door Pam₃CSK₄ en flagelline. De overlap omvat een groep van bekende immuunsysteemfactoren waarvan voorheen al aangetoond was dat ze geïnduceerd worden door flagelline, zoals de genen *il1b*, *tnfa*, *irak3*, *mmp9*, *cxcl-c1c* en *il8*. Opvallend is dat de genen *il6* en *il10*, die geassocieerd zijn met een anti-inflammatoire reactie, veel sterker geïnduceerd worden door Pam₃CSK₄ dan door flagelline. Een relatief veel grotere groep genen vertoonde een volledig verschillende reactie op Pam₃CSK₄ of flagelline, waaronder een groep genen waarvan de transcriptie alleen reageert op één van de twee behandelingen. De groep genen die specifiek alleen reageert op de stof Pam₃CSK₄ omvat een aantal transcriptiefactoren die meer dan twee keer omhoog gaan in expressie zoals *cebpb*, *fosb*, *nr4a1* en *egr3*. Er is vervolgens aangetoond dat de activering van de groepen van genen die specifiek reageren op behandeling met Pam₃CSK₄ of flagelline geblokkeerd wordt door het

uitschakelen van, respectievelijk, Tlr2 of Tlr5. Deze studie toont daarmee aan dat toediening van Pam₃CSK₄ of flagelline aan zebrawislarven specifiek de signaaltransductie door Tlr2 of Tlr5 kan activeren met als gevolg een aantal reacties waarvan sommige algemeen zijn voor beide behandelingen en andere uitsluitend met één van de behandelingen optreden.

Om de functie van Tlr2 in de afweer van de gastheer tegen infectie door *M. marinum* verder te bestuderen hebben we, zoals beschreven in **hoofdstuk 3**, een infectiestudie uitgevoerd met zebrawislarven die gemuteerd zijn in dit gen. De Tlr2-specifieke genen die in hoofdstuk 2 waren geïdentificeerd vertonen een significante verhoging van de transcriptie na infectie met *M. marinum* in het wildtype maar echter niet, of minder sterk, in de Tlr2-mutant. Bovendien bevatten ongeïnfecteerde Tlr2-mutanten een verminderd aantal macrofagen, wat mogelijk veroorzaakt wordt door een afwijking in de productie en differentiatie van hematopoïetische stamcellen. Na infectie met *M. marinum* vertoont de mutant een verhoogde proliferatie van bacteriën en een gereduceerd aantal granulomen. De resultaten wijzen er ook op dat macrofagen in de Tlr2-mutant een hogere migratiesnelheid hebben, aangezien de maximale afstand van migratie van geïnfecteerde macrofagen vanaf een infectiebron groter was dan in de heterozygote controle. Dit zou mogelijk verklaard kunnen worden doordat Tlr2-deficiënte macrofagen minder actief zijn in fagocytose. Vervolgens zijn de transcriptoomreacties op infectie bepaald in de Tlr2-mutant en de heterozygote controle met behulp van RNA-sequentieanalyse. De resultaten tonen aan dat de mutatie van Tlr2 als gevolg heeft dat er veel minder verandering in de transcriptieniveaus van immuogenen plaatsvindt na infectie met *M. marinum*. Daarnaast zijn andere genen betrokken bij diverse processen, zoals oxidatie-reductie, DNA-herstel, transcriptionele regulatie en apoptose, afhankelijk van Tlr2 voor hun transcriptionele reactie op infectie. De interacties tussen de genen waarvan de regulatie afhankelijk is van Tlr2 zijn onderzocht met een methode voor de analyse van genetische netwerken. Een voorbeeld van een resultaat dat met deze netwerkanalyse is gevonden is dat de signaaltransductiemechanismen die door vitamine D worden gereguleerd normaalgesproken worden geactiveerd als gevolg van infectie, maar in de Tlr2-mutant juist worden uitgezet. Dit is interessant omdat al eerder was aangetoond dat vitamine D een belangrijke regulerende factor is tijdens de ontwikkeling van tuberculose en ook in studies met celculturen in verband is gebracht met de functie van Tlr2. Samenvattend kan uit deze resultaten geconcludeerd worden dat Tlr2 een rol speelt als beschermende factor tegen infectie met mycobacteriën.

Om de functies te bestuderen van factoren die een rol spelen in de signaaltransductie door de Tlr-receptoren is er in **hoofdstuk 4** een analyse uitgevoerd van zebrawisstammen met mutaties in de genen *traf6* en *ikk2*. Deze mutaties betreffen puntmutaties die leiden tot een stopcodon in het begin van de eiwitleesramen van deze genen. Beide mutanten vertoonden geen zichtbare orgaanafwijkingen tijdens de

embryonale en latere ontwikkelingsstadia en de volwassen vissen waren ook in staat zich normaal voort te planten. Deze resultaten waren onverwacht omdat knaagdiermutanten waarin dezelfde genen zijn uitgeschakeld niet levensvatbaar zijn.

In het geval van de Traf6-mutant bleek er geen significant verschil met het wildtype wat betreft ontwikkeling van leukocyten en het verloop van het proces van infectie met mycobacteriën. Dit leidde tot de hypothese dat de bestudeerde mutatie in het *traf6*-gen niet resulteert in een uitschakeling van de functie op eiwitniveau. Dit is mogelijk het geval doordat er een alternatief startcodon dichtbij de mutatiepositie aanwezig is dat gebruikt kan worden om de eiwittranslatie opnieuw op te starten. Hoewel het ontbrekende gedeelte van dit hypothetische resulterende eiwit wel aanwezig is in de homologen van Traf6 in zoogdieren, is het overblijvende gedeelte mogelijk nog functioneel omdat dit het zogenoemde RING-domein bevat, dat bekend staat als een essentieel domein in het N-terminale gedeelte van het Traf6-eiwit. Het is echter niet bekend of de translatiemechanismen in de zebravis in staat zijn opnieuw op te starten na een stopcodon. Een andere mogelijke verklaring voor het gebrek aan fenotype van de Traf6-mutant is dat de mutatie gecompenseerd wordt door een andere mutatie in het genoom die het resultaat is van de gebruikte mutagenesemethode. Een aanwijzing voor deze verklaring is dat we slechts één homozygote mutant verkregen na het inkruisen van de eerste generatie heterozygote stamouders. Deze andere mutatie kan geleid hebben tot een verkeerde regulatie van naaste verwanten van het Traf6-eiwit die mogelijk de functie van Traf6 kunnen overnemen. Het is daarom noodzakelijk om nieuwe mutanten in het *traf6*-gen te construeren om deze mogelijkheden verder te onderzoeken.

Larven van de *Ikk2*-mutant vertoonden een significante afname in lichaamsgrootte, aantallen leukocyten en transcriptionele expressie van merker genen van macrofagen en neutrofielen. Verder vertoonde deze mutant een toegenomen bacteriële proliferatie na infectie met *M. marinum* vergeleken met het wildtype. Een onverwachte waarneming was dat het bekende immuun gen *il1b* een hogere expressie had na injectie van flagelline dan in de controle. Dit resultaat kan mogelijk verklaard worden doordat de expressie van het gen dat codeert voor *Ikk1* verhoogd is in de *Ikk2*-mutant en dat dit gen een compenserende rol speelt om het *il1b*-gen aan te zetten. Deze hypothese kan verder getest worden door de constructie van dubbelmutanten van *Ikk1* en *Ikk2*. Er is in voorgaand onderzoek aangetoond dat *Ikk2* een rol speelt in insuline-siginaaltransductie in zoogdieren. In overeenstemming hiermee hebben wij gevonden dat de resistentie tegen insuline die wordt geïnduceerd door een overmaat aan insuline gemoduleerd is in de *Ikk2*-mutant van de zebravis.

De hoofdconclusie die uit deze studies kan worden getrokken is dat TLR-siginaaltransductie een essentiële rol speelt in de immuniteit en het bewaren van een natuurlijk metabool evenwicht. De transcriptoomprofielen die het resultaat zijn van

activering van verschillende TLR-receptoren zijn in dit proefschrift op systeemniveau beschreven. Hiermee is aangetoond dat er naast algemene effecten ook specifieke effecten zijn die door de TLR2- en Tlr5-receptoren worden geactiveerd en die nog niet eerder bekend waren (**Hoofdstuk 2**). Door gebruik te maken van een Tlr2-mutant is inzicht op het niveau van transcriptie en cellulaire reacties verkregen in de rol van Tlr2 bij de afweer van zebrafishlarven tegen infectie met *M. marinum* (**Hoofdstuk 3**). Deze Tlr2-mutant is erg geschikt voor toekomstige studies naar andere microbiële infecties, naar de reactie van de gastheer op de microbiële darmflora en voor onderzoek naar metabole afwijkingen zoals diabetes type II waarbij het immuunsysteem een belangrijk rol speelt. In de studie beschreven in **hoofdstuk 4** is gebleken dat de Ikk2-mutant naast een functie in de aangeboren afweer tegen mycobacteriële infectie ook een rol speelt in de regulatie van het metabolisme, zoals aangetoond door het effect van de mutatie op insulineresistentie die wordt geïnduceerd door een overmaat aan insuline. Zoals bediscussieerd in **hoofdstuk 5** biedt het werk in dit proefschrift daarom nieuwe mogelijkheden om de koppeling tussen het aangeboren immuunsysteem en de controle van metabole afwijkingen verder te bestuderen.

